

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

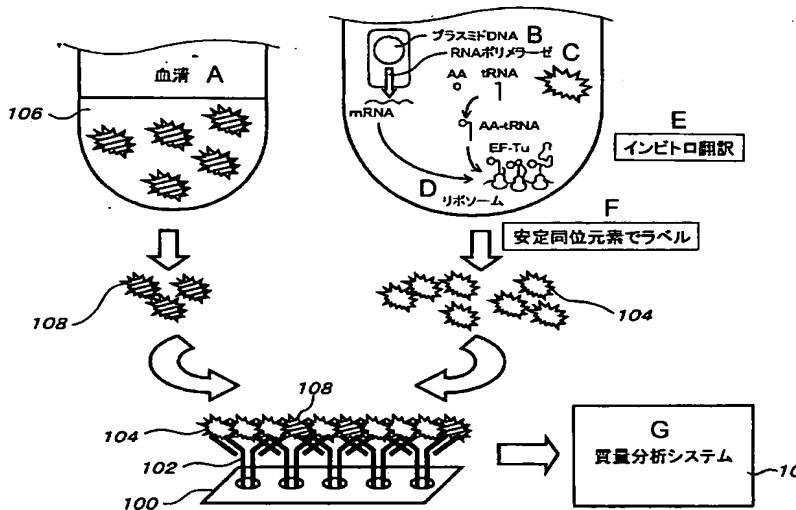
(10) 国際公開番号
WO 2004/019026 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 27/64, 33/68, H01J 49/10, 49/04
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010706
(22) 国際出願日: 2003年8月25日 (25.08.2003)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願2002-245706 2002年8月26日 (26.08.2002) JP
(71) 出願人 および
(72) 発明者: 林崎 良英 (HAYASHIZAKI, Yoshihide) [JP/JP];
〒305-0061 茨城県 つくば市 稻荷前 2-2-8 Ibaraki (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 谷畑 勇夫 (TANI-HATA, Isao) [JP/JP]; 〒350-0435 埼玉県 入間郡 毛呂山町 8-6-7-8 O Saitama (JP).
(74) 代理人: 上島 淳一 (UESHIMA, Junichi); 〒171-0021 東京都 豊島区 西池袋 1-5-1 1-4 O 4 Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF ANALYZING PROTEIN USING LASER ABLATION

(54) 発明の名称: レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法



- A...SERUM
B...PLASMID DNA
C...RNA POLYMERASE
D...RIBOSOME
E...IN VITRO TRANSLATION
F...LABELING WITH STABLE ISOTOPE
G...MASS SPECTROMETRIC SYSTEM

(57) Abstract: A method of analyzing a protein using laser ablation which comprises, in order to simultaneously atomize the atoms constituting the protein to be analyzed and ionize the same using a single laser source, irradiating the protein with laser beams and thus ablating the protein to thereby atomize the protein into the constituting elements and ionize the thus atomized constituting elements, and then analyzing the constituting elements thus ionized. The laser beams for ablating the subject protein are ultra-short pulse laser beams with which a chip having the protein fixed thereon is irradiated. Thus, the protein fixed on the chip is ablated with the ultra-short pulse laser beams so that the protein is atomized into the constituting elements and, at the same time, ionized followed by the analysis of the constituting elements thus ionized.

(57) 要約: タンパク質を構成する構成原子の原子化とイオン化とを単一のレーザー源で同時に実現するために、分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析する。

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーション

[続葉有]



SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法

5 技術分野

本発明は、レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に関し、さらに詳細には、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することを可能にしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に関し、例えば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質の質量分析に用いて好適なレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に関する。

10

背景技術

近年、質量分析法の応用範囲は、物理や化学の分野から医学や生化学などのライフサイエンスの分野へと急速に広がってきている。特に、タンパク質の分子量

15

の決定解析やアミノ酸配列の決定解析などへの発展は著しい。
こうした質量分析法の原理は、試料を様々な方法でイオン化して、イオン化により得られたイオンを質量／電荷に従って分離し、分離した各イオンの強度を測定するというものである。

20

ところで、従来のタンパク質の質量分析は、タンパク質そのものに電子を付加してイオン化し、その質量を解析したり、高分子量の分子を低分子量の分子イオ

ンに細分化して質量分析を行い、構成分子を比較するというものであった。

ここで、従来のタンパク質の質量分析におけるイオン生成方法としては、例えば、タンパク質に高エネルギー原子イオンを衝突させてイオン化する２次イオン
5 質量分析（SIMS）法や、電子衝撃によって低分子量の分子イオンに細分化して質量分析を行う電子イオン化（ED）法、マトリックス支援レーザーイオン化（MALDI）法などが知られている。

しかしながら、上記したいずれの方法においても、高分子イオンを質量分析するため高分解能の質量分析装置が必要であるという問題点や、中途半端に分解生
10 成したフラグメントイオンの存在が質量スペクトルの解析を困難にするという問題点などがあった。

一方、従来より、化学分析に際して同位元素で標識した試料の質量分析方法としては、例えば、ナノ秒レーザーにより原子化およびイオン化を行うレーザー原
15 子化共鳴イオン化（LARIMP）法が知られている。

しかしながら、このLARIMP法によれば、レーザーとして、標識元素を原子化するための原子化レーザーと原子化された標識元素の原子をイオン化するための共鳴イオン化レーザーとの２台のレーザー源が必要となるため、システム構成が複雑になるという問題点があった。

20 さらに、LARIMP法においては、上記したように標識元素の原子を共鳴イオン化する必要があるため、各標識元素の原子に対して固有の波長のレーザー光

を照射する必要がある、多種類の標識同位体が混入した状況では効率の良い分析を行うことが極めて困難であるという問題点があった。

本発明は、上記したような従来の技術の有する種々の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を構成する構成原子の原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、高分解能の分析装置を用いることを要しないようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法を提供しようとするものである。より詳細には、例えば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質の質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除するとともに、質量分析装置に高分解能を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の質量分析方法を提供しようとするものである。

また、本発明の目的とするところは、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザー源で同時に実現することを可能にして、レーザーの照射制御を大幅に簡潔にすることを可能にしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法を提供しようとするものである。

さらに、本発明の目的とするところは、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことを可能にしたレーザーアブレーションを用

いたタンパク質の分析方法を提供しようとするものである。

発明の開示

上記目的を達成するために、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法は、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、それらタンパク質を原子イオン化して原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたものである。これにより、各種のタンパク質の化学分析を行うことができるものである。

10 即ち、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法によれば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、タンパク質をバラバラに分解して当該タンパク質を構成する各原子毎に原子化すると同時に、原子化した原子を1価のイオンにイオン化するものであり、このイオン化により生成された原子イオンを分析することにより、定量分析が可能となるものである。

従って、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において質量分析を行う場合には、低質量の原子イオンを質量分析することになり、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができるのみならず、高分解能を備えた質量分析装置を用いる必要がなくなる。

20 また、上記したように、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法によれば、一種類の超短パルスレーザー光でタンパク質をアブレーション

ョンすることにより、タンパク質の原子化と同時に、原子化された原子の一価のイオンへのイオン化を効率良く行うことが可能となる。従って、レーザーの照射制御が簡潔になるとともに、例えば、化学分析に際して多種類の標識元素を同時に使用することが可能となるため、解析効率を著しく向上することができる。

- 5 つまり、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法においては、標識元素の原子化とイオン化とを一種類の超短パルスレーザー光で同時に行うことができるため、分析作業を大幅に簡略化することが可能となり、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することができるようになる。

- さらに、上記したイオン化は、超短パルスレーザー光の高い尖頭値強度によって非共鳴過程によって行われるイオン化（非共鳴イオン化）であるので、多種類の標識同位体が混入した状況においても各標識原子をそれぞれイオン化することができ、多標識系への応用が容易であり、高精度かつ高効率な高分子の分析を行うことができるようになる。

- 15 即ち、本発明は、分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、タンパク質を固定したチップに対して該超短パルスレーザー光を照射して、該チップに固定されたタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーション
- 20

ションすることによって、該タンパク質を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析するようにしたものである。

また、本発明は、上記タンパク質を固定したチップを、該チップに固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質に、該特定のタンパク質が反応して結合することにより、該チップ上に該特定のタンパク質が固定されたものとしたものである。

また、本発明は、上記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質を、タンパク質と特異的な結合性を持った分子としたものである。

また、本発明は、上記タンパク質と特異的な結合性を持った分子を、タンパク質と特異的な結合をする核酸としたものである。

また、本発明は、上記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質を、タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質であるとしたものである。

また、本発明は、上記タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質を、抗体としたものである。

また、本発明は、上記タンパク質を固定したチップは、上記抗体を固定したチップに上記抗体と反応するタンパク質を含む溶液をかけて、上記抗体と反応するタンパク質と上記抗体とを反応させ、上記抗体と反応するタンパク質と上記抗体とを結合させて作成するようにしたものである。

また、本発明は、上記チップに固定されたタンパク質に、元素標識を付けるようにしたものである。

また、本発明は、上記元素標識を、安定同位元素標識としたものである。

また、本発明は、上記元素標識を、ピューロマイシン誘導体を用いて標識するようにしたものである。

また、本発明は、上記元素標識を、サンドイッチ法により標識するようにした
5 ものである。

また、本発明は、上記元素標識は、サンプル中のタンパク質に直接標識されたものであるようにしたものである。

また、本発明は、上記チップを、マルチチャンネル化したチップとしたものである。

10 また、本発明は、分析の対象であるタンパク質を含むサンプルと該分析の対象であるタンパク質に標識を付けた標識タンパク質溶液とを混合して上記チップにかけて、上記に固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質と上記分析の対象であるタンパク質と上記標識タンパク質とを競合的に結合させる
competitive assayを行い、上記チップ上に該特定のタンパク
15 質を固定するようにしたものである。

また、本発明は、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする超短パルスレーザー光を、パルス時間幅が10ピコ秒以下であり、尖頭値出力が10メガワット以上であるようにしたものである。

また、本発明は、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする超短パルスレーザー光を、パルス時間幅が1フェムト秒以上1
20 ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下であるよ

うにしたものである。

また、本発明は、タンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光と分析の対象であるタンパク質とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、該タンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光により該分析の対象であるタンパク質を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしたものである。

また、本発明は、上記イオン化した構成元素の分析は、飛行時間法による質量分析であるようにしたものである。

また、本発明は、上記チップ側に固定する物質を混合物として固定し、該混合物に測定したい物質ごとに異なる標識をつけた溶液を反応させ、該混合物から複数種類の物質を検出するようにしたものである。

また、本発明は、上記チップにサンプルを固定し、測定対象に対する抗体を複数種類でラベルしたものをかけ、複数の物質を測定するようにしたものである。

ここで、本発明において超短パルスレーザー光によりタンパク質をアブレーションする際には、タンパク質に超短パルスレーザー光を1ショット（1パルス）照射すれば十分である。しかしながら、タンパク質に超短パルスレーザー光を複数ショット（複数パルス）照射してもよく、タンパク質へ照射する超短パルスレーザー光のショット数（パルス数）は適宜に選択すればよい。

また、超短パルスレーザー光とは、パルス時間幅が10ピコ秒以下であることが好ましく、例えば、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下の通常はフ

フェムト秒レーザーと称されるレーザーから照射されるフェムト秒レーザー光を用いるのが適当である。

また、超短パルスレーザー光の尖頭値出力としては、10メガワット以上が好ましく、さらに詳細には、1ギガワット以上10ギガワット以下が好ましい。

- 5 その理由は、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が10ギガワット以上に大きいと、多価イオンが生成されて質量スペクトルの解析が困難となる恐れがあり、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が10メガワット以下であると、原子化・イオン化の効率が低下して原子イオン信号を観測することが困難となる恐れがあるからである。

- 10 なお、後述する本願発明者による実験によれば、例えば、パルス時間幅が110フェムト秒、尖頭値出力2ギガワットの場合には、極めて良好な結果を得ることができた。

- また、本発明によれば、原子化と同時にイオン化を効率良く行うことのできる
15 フェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を、同位元素などで標識したタンパク質試料に照射するようにしている。このため、標識元素を選択的にイオン化する必要が無くなり、種々様々な標識元素を使用することが可能となる。その上、レーザー照射の繰り返しレートを数kHzまで上げることが可能であるため、高速解析に適している。

また、本発明では、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの分析の

対象の各種のタンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光と当該分析の対象であるタンパク質とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、当該短パルスレーザー光により当該分析の対象であるタンパク質を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしている。即ち、本発明においては、例

5 えば、短パルスレーザー光のスポットと試料として分析の対象であるタンパク質を固定したチップとの移動により、広い面積にわたって固定された多数のタンパク質試料を遺漏・重複することなくアブレーションすることを可能にしている。

これは、分析したい対象のタンパク質に対する抗体を固定したチップに、抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップなどを利用することを可能とするもので

10 あって、特に有効である。

本発明によれば、これらの特徴から、解析速度が従来と比較して格段に早くなる。

ここで、本発明の具体的な応用例としては、例えば、上記したような抗体を固定したチップに、抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップを用いたタンパク質の解析があり、その解析を高速化することが可能となる。

15

この際に、本発明によれば、標識として元素標識を用いることが可能となる。

さらに詳細には元素標識として、多種類の同位元素を用いることが可能となり、元素標識として、例えば、安定同位元素を用いれば、標識の種類は多種類の安定

20 同位体の数（270種類）にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法（2～6種類）や放射性同位元素（約10種類）と比較して、飛躍的に

情報量を増やすことができることを意味している。

より詳細には、抗体を固定したチップに抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップを用いたタンパク質解析の実験で使用する標識として、例えば、周期律表において1族の安定同位体である ^{39}K 、 ^{41}K など、周期律表において16族の安定同位体である ^{32}S 、 ^{35}S など、周期律表において17族の安定同位体である ^{35}Cl 、 ^{37}Cl など、周期律表において遷移金属の安定同位体である ^{118}Sn 、 ^{120}Sn などの安定同位元素でタンパク質を標識して使うことが可能となる。

タンパク質を上記チップ上のターゲットとなるタンパク質と結合させたのち、超短パルスレーザーでアブレーションし、分子の原子イオン化を行い、その後、例えば、質量分析器で質量を検出すれば、結合したタンパク質内に含まれていた同位元素の量を定量できる。従って、標識分子の量比を計算することによりターゲットとなるタンパク質を分析することができる。

ここで、現在利用されている標識と比較すると例えば、安定同位元素を使えば、標識の種類を270種にも増やすことができる。

さらに、別々の元素でラベルした3種類以上の複数のタンパク質を混合し、同時にターゲットと結合反応させたマルチチャンネル化したチップを用いると、複数試料間のデータを比較することができる。

このように、本発明によって、多種類の安定同位元素標識による高感度・高速質量分析法を確立することができるものであり、従って、本発明は、蛍光色素や放射性同位元素で標識を行っている全ての研究分野へ応用可能である。

また、本発明によれば、標識元素に放射性同位元素を用いることなく、安定同

位元素を用いることができるので、その場合には使用される施設に制限を受けな
いため、医療施設や民間企業への設置も可能となる。

また、本発明において、一度に複数の標識を使うマルチチャンネル化について
は、チップ側に固定する物質をマイクロアレイのように種類ごとにスポットする
5 のではなく、混合物として固定し、そこに測定したい物質ごとに異なる標識をつ
けた溶液を反応させれば、一つのスポットから複数種類の物質を検出することが
できるようになる。

このようにすると、マイクロアレイを作製する手間を大幅に省くことができる
ようになり、ユーザーが測定したい物質を含む溶液を調整するオーダーメイドの
10 基板が簡単に作れるようになる。

また、逆にサンプルを基板上に載せることも可能であり、例えば、測定したい
対象に対する抗体をいろいろな種類でラベルしたものをかければ、複数の物質を
測定することができる。

15 図面の簡単な説明

図1は、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法
を実施する際に用いることが可能な分析システムの一例たる、タンパク質の質量
を分析するための質量分析システムの構成の一例の概念構成説明図である。

図2は、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法
20 の一例を示す説明図である。

図3は、測定したいタンパク質を標識する手法として、抗体を使ったサンドイ

タッチ法を説明するための説明図である。

図 4 は、本願発明者による実験 1 に用いたターゲットとなるチップの説明図である。

図 5 は、本願発明者による実験 1 の実験結果を示し、四重極質量分析器によつて測定されたスポット 1 ならびにスポット 2 のアブレーションによる質量スペクトラムを示すグラフである。

図 6 は、図 5 に示されたスポット 2 のアブレーションにより測定された質量スペクトラムのみを抽出して示すグラフである。

図 7 は、本願発明者による実験 2 に用いたターゲットとなるチップの説明図である。

図 8 は、実験 2 で用いたチップ 1 およびチップ 2 と測定結果を示す図との対応関係を示す説明図である。

図 9 は、チップ 1 におけるスポット 1 のアブレーションにより測定された TOF スペクトルのグラフである

図 10 は、チップ 1 におけるスポット 2 のアブレーションにより測定された TOF スペクトルのグラフである。

図 11 は、チップ 2 におけるスポット 1 のアブレーションにより測定された TOF スペクトルのグラフである、

図 12 は、チップ 2 におけるスポット 2 のアブレーションにより測定された TOF スペクトルのグラフである。

図 13 は、実験 3 のサンプル濃度が 0.2 mg/ml の場合におけるアブレーション

ションにより測定されたTOFスペクトルのグラフである。

図14は、TOFスペクトルより算出したサマリウム（Sm）の検出量を示す図表である。

図15は、サンプル濃度と検出されたSm量との関係を示すグラフである。

5

符号の説明

	10	質量分析システム
	12	真空槽
	14	ターゲット
10	16	四重極質量分析器
	18	回転導入端子
	20	超短パルスレーザー
	22	フォーカスレンズ
	100	チップ
15	102	抗体
	104	標識タンパク質
	106	サンプル
	108	サンプル中に含まれる目的のタンパク質
	200	チップ
20	202	抗体
	206	サンプル

208	サンプル中に含まれる目的のタンパク質
210	標識元素
212	抗体（標識抗体）
1000	基板
5 2000	基板

発明を実施するための最良の形態

以下、添付の図面を参照しながら、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法の実施の形態の一例を詳細に説明するものとする。

- 10 本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法によれば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を分析することができる。

図1には、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法を実施する際に用いることが可能な分析システムの一例として、タンパク質の質量を分析するための質量分析システムの構成の一例の概念構成説明図が示されている。

この質量分析システム10は、例えば $10^{-8} \sim 10^{-6}$ Torrの真空度に設定可能な真空槽12と、この真空槽12内に配置されたターゲット14と、真空槽12内に配置された質量分析器としての四重極質量分析器16と、ターゲット1

4を回転する回転導入端子18と、例えばフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を出射してターゲット14へ照射する超短パルスレーザー20と、超短パルスレーザー20から照射された超短パルスレーザー光をターゲット14上へ集光するフォーカスレンズ22とを有している。

5 ここで、超短パルスレーザー20としては、フェムト秒レーザーなどのような、例えば、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下である超短パルスレーザー光を照射可能なものを用いることができる。

より詳細には、こうした超短パルスレーザー20は、例えば、チタンサファイアレーザーにより構成され、以下に示すようなパラメータを備えているものを用いることができる。即ち、

ピーク幅（パルス時間幅）：～110 fs（フェムト秒）

出力 : 50～480 μ J (マイクロジュール)

(尖頭値出力：0.5～4GW（ギガワット））

15 波長 : ~800nm (ナノメートル)

繰り返し : 1 kHz (キロヘルツ)

である。

また、四重極質量分析器 16 は、超短パルスレーザー 20 から出射されてター
ゲット 14 に照射される超短パルスレーザー光の照射方向に対して、90 度垂直
方向に設置されている。

なお、質量分析器としては、上記した四重極質量分析器 16 に代えて、飛行時間型質量分析器 (TOF MASS) を用いるようにしてもよいことは勿論である。

また、超短パルスレーザー 20 から出射された超短パルスレーザー光を集光するフォーカスレンズ 22 の焦点距離は、例えば、25 cm に設定されている。

以上の構成において、上記した質量分析システム 10 などを用いて、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法により質量分析を行う手法について説明する。

10 ここで、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法は、フェムト秒レーザーなどの超短パルスレーザー 20 から出射された超短パルスレーザー光によるアブレーションと、四重極質量分析器 16 や飛行時間型質量分析器などのような質量分析器などの分析器による分析とを用いて、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質の試料を検出して分析
15 を行うものである。

即ち、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法は、分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して当該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、分析の対象であるタンパク質に照射して、当該タンパク質をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、
20

タンパク質を固定したチップに対して当該超短パルスレーザー光を照射して、当該チップに固定されたタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることによって、当該タンパク質を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析するものである。

- 5 具体的には、タンパク質を固定したチップをターゲット 14 として真空槽 12 内に配置し、ターゲット 14 たるチップに超短パルスレーザー 20 から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器 16 あるいは飛行時間型質量分析器などの質量分析器により分析するものである。
- 10 この際に、分析の対象となるタンパク質に元素標識などにより標識を付しておくようにすると、標識を付したタンパク質を固定したチップをターゲット 14 として真空槽 12 内に配置し、ターゲット 14 たるチップに超短パルスレーザー 20 から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行って、四重極質量分析器 16 あるいは飛行時間型質量分析器
- 15 などの質量分析器により標識元素を測定することにより、分析対象となるタンパク質を検出して分析することができる。

- ここで、タンパク質を固定したチップは、例えば、チップに固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質（抗体など）に、タンパク質が反応
- 20 して結合することにより、当該チップ上にタンパク質が固定されたものを用いることができる。具体的には、タンパク質を固定したチップは、例えば、分析の対

象であるタンパク質に対する抗体を固定したチップに、抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップを用いることができる。

従って、標識したタンパク質を固定したチップは、例えば、以下のようにして作成することができる。

- 5 即ち、特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質（抗体など）を固定したチップに、サンプルたる標識したタンパク質の溶液をかけるなどして、標識したタンパク質と上記特異的な結合をする物質とを反応させ、標識したタンパク質の中の特定のタンパク質をチップに固定する。さらに、標識したタンパク質の中の特定のタンパク質を固定したチップの洗浄を行うことにより、標識したタン
- 10 パク質を固定したチップが得られる。

- ここで、DNAチップと同様に、一枚のチップ上にそれぞれ特定のタンパク質と特異的な結合をする物質（抗体など）を何種類も固定したチップを用いて、当該何種類もの特異的な結合をする物質（抗体など）とそれぞれ結合したタンパク質を固定したチップを用いることにより、同時に多種類のタンパク質について測
- 15 定することが可能となる。

また、チップに固定する特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質としては、タンパク質と特異的な結合性を持った分子や、さらには、抗原抗体などのようにタンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質を用いることができる。

- 20 なお、タンパク質と特異的な結合性を持った分子としては、例えば、抗体と同じような特異的結合をするアプタマーと呼ばれる核酸を用いることができる。ア

プタマーは、ランダムに合成したオリゴヌクレオチドのプールより、タンパク質などのターゲットとなる物質と結合性をの高いものを選択する S E L E X と称される手法を使って作成することができる。

また、抗原抗体などのようにタンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質としては、抗原抗体の他に、リガンドとレプターや、複合体を形成するタンパク質など生体内で特異的に結合することがわかっているものなどを用いることができる。

ここで、上記した本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法の一例について、図 2 を参照しながらより詳細に説明する。

即ち、上記した本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法においては、まず、検出したいタンパク質に対する抗体 102 を固定したチップ 100 を作成する。

次に、検出したいタンパク質をインビトロ翻訳 (in vitro translation) などで合成し、当該タンパク質に含まれない元素 (例えば、S e, E u, S m, T b, F e などの安定同位元素) で標識 (ラベル) して標識タンパク質 104 を作成する。

ここで、標識方法としては、例えば、セレメチオニン法、ピューロマイシン誘導体を用いた in vitro virus 法などを用いることができる。

なお、in vitro virus 法では、蛍光色素による標識などが一般的であるが、元素標識体を合成し、蛍光色素による場合と同様な方法で元素標識

することができる。

次に、合成した標識タンパク質 104 の濃度を変えた溶液を何種類か測定して、検量線をとっておく。

次に、生体から採取したサンプル 106（例えば、血清など）と濃度調整をした標識タンパク質溶液を混合し、混合したものをチップ 100 にかけて competitive assay し、抗原抗体反応により、抗体 102 と標識タンパク質 104 ならびにサンプル 106 中に含まれる目的のタンパク質 108 とを競合的に結合させる competitive assay を行い、抗体 102 と標識タンパク質 104 ならびにサンプル 106 中に含まれる目的のタンパク質 108 とが結合して固定されたチップ 100 を洗浄して乾燥させた後に、この目的のタンパク質 108 が固定されたチップ 100 をターゲット 14 として超短パルスレーザー 20 からのフェムト秒レーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器 16 や飛行時間型質量分析器により標識元素を測定することにより、標識タンパク質 104 が抗体 102 と反応した量を測定して、サンプル 106 中に含まれる目的のタンパク質 108 の濃度を検出して分析するものである。

ここで、チップの状態により検量線に違いが生じる可能性があるので、それを防ぐためには、検量線の作成とサンプルの測定とを同じチップ上で同時に行うことが望ましい。

20 即ち、こうした問題点を解決するためには、抗体と標識タンパク質ならびにサンプル中に含まれる目的のタンパク質とが結合したチップをマルチチャンネル化

すればよく、このマルチチャンネル化により、上記した本発明による手法の精度をさらに上げることができる。

このマルチチャンネル化は、例えば、以下に説明する手法により実現することができる。

- 5 つまり、チップの状態により検量線に違いが生じる可能性があるので、それを防ぐためには、検量線の作成とサンプルの測定とを同じチップ上で同時に行うことが望ましいものであり、そのために、Aというタンパク質の測定をしようとするとき、濃度毎に異なる標識（例えば、Feの同位体何種類かで標識する。）をした標識タンパク質の溶液を準備し、これをサンプルと混合して抗体を固定した
- 10 チップに反応させると、検量線作成とサンプル測定を同時に行うことが可能となる。

- 次に、測定したいタンパク質を標識する手法としては、上記したようなサンプルと混合する前に標識タンパク質を予め合成する方法の他に、抗体を使ったサンドイッチ法を用いるようにしてもよい。このサンドイッチ法について、図3を参照しながら説明する。
- 15 ドイッチ法を用いるようにしてもよい。このサンドイッチ法について、図3を参照しながら説明する。

このサンドイッチ法においては、まず、検出したい目的のタンパク質に対する抗体202を固定したチップ200にサンプル206を反応させ、サンプル206中に含まれる目的のタンパク質208と抗体202とを結合させる。

- 20 次に、抗体202と結合したサンプル206中に含まれる目的のタンパク質208の上から、標識元素210により標識した抗体（標識抗体）212をかけ、

サンプル 206 中に含まれる目的のタンパク質 208 と標識抗体 212 とを反応させて結合する。

次に、抗体 202 とタンパク質 208 と標識元素 210 により標識した標識抗体 212 とが結合したチップ 200 を洗浄して乾燥させた後に、このチップ 200 をターゲット 14 として超短パルスレーザー 20 からのフェムト秒レーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器 16 や飛行時間型質量分析器により標識元素 210 を測定することにより、サンプル 206 中に含まれる目的のタンパク質 208 の濃度を検出して分析するものである。

10 また、サンドイッチ法としては、上記に限られるものではなく、例えば、検出したい目的のタンパク質をサンドイッチして挟み込む際の上側の抗体の産生動物をチップに固定した抗体と違ったものを選び、標識 2 次抗体をさらに上からかけて検出するようにしてもよい。

15 また、測定したいタンパク質を標識する手法としては、サンプル中のタンパク質を直接標識する手法を用いてもよい。

具体的には、例えば、サンプル中に含まれるタンパク質をヨードでラベルするようにしてもよい。このタンパク質をヨードでラベルする手法としては、例えば、I o d o - B e a d 法 (P i e r c e 社の商標) を用いて行うことができる。

20 そして、サンプル中のタンパク質を直接標識したサンプルを用いる場合には、当該サンプルを、検出したい目的のタンパク質に対する抗体を固定したチップに

かけて、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質と抗体とを反応させ、抗原抗体反応により、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質と抗体とを結合する。

次に、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質と抗体とが結合した
5 チップを洗浄して乾燥させた後に、このチップをターゲット14として超短パルスレーザー20からのフェムト秒レーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器16や飛行時間型質量分析器により標識元素を測定することにより、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質の濃度を検出して分析するものである。

10

以下に、上記した質量分析システム10を用いて、本願発明者が行った質量分析の実験結果について説明する。

(1) 実験1

(1-1) チップの作成

15 まず、ターゲット14となるチップの作成について、図4を参照しながら説明する。このチップの作成は、以下のように行う。

即ち、ポリレーリジンコートスライドガラスを基板1000として用いた。このポリレーリジンコートスライドガラスは、スライドガラスをNaOH処理後に3%ポリレーリジン溶液に1時間浸漬し、水で洗浄後に80℃で乾燥させて作成
20 した。次に、ウサギ抗ヒトヘモグロビン抗体（シグマ社製），ウサギ抗ヒトIgG抗体をPBSに各々0.2mg/mlの濃度で分解し、上記のようにして作成

したポリ-L-リジンコートスライドガラスにそれぞれスポットティングした（図4
参照：スポット1はウサギ抗ヒトIgG抗体であり、スポット2はウサギ抗ヒト
ヘモグロビン抗体である。）。そして、3% non-fat milk, 0.1%
Tween-20を含むPBS溶液で余分な抗体を除去した後に、3% non-
5 fat milk, 0.02% アジ化ナトリウムを含むブロッッキング溶液に浸漬
し、4℃で一晩静置した。さらに、10,000x g で10分間遠心後に、
PBSで洗浄してブロッッキング溶液を除去し、抗体を固定したチップを作成した。

ここで、基板の材質はガラスである必要はなく、金属や絶縁体であっても良い。
超短パルスレーザー光を用いたレーザーアブレーションでは、熱伝導度の高い基
10 板が、より高いイオン検出効率を与える。なお、基板としては固体を用いるもの
であり、この基板として用いる固体の熱伝導率は $0.1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ 以上
であることが好ましい。

(1-2) タンパク質溶液の調整と反応

次に、タンパク質溶液の調製とチップに固定された抗体との反応を行う。この
15 タンパク質溶液の調製と反応は、以下のように行う。

ヒトヘモグロビン(和光純薬工業製)をPBSに 2 mg/ml の濃度で溶解し、
タンパク質の溶液を調製した。抗体を固定したチップから余分なPBSを振り落
とし、すぐにタンパク質溶液を抗体を固定したチップ表面に載せ、上からカバー
ガラスを静かに被せ、4℃で2時間静置した。その後、当該チップをPBSに浸
20 漬してカバーガラスとタンパク質溶液を除き、 0.005 M Tris-HCl 、
 $0.005\% \text{ Tween 20}$ 、 $\text{pH } 7.8$ 処理し、続いてPBSで処理した後に

乾燥して、ターゲット14となるチップを得た。

(1-3) 測定

上記のようにして作成したターゲット14を真空槽12内に装着して、真空槽12内を真空に引いて、真空槽12内の真空度が 10^{-6} Torr以下となるよう

5 に設定する。

次に、超短パルスレーザー20から出射された超短パルスレーザー光を、フォーカスレンズ22を用いてターゲット14上に集光して、ターゲット14上に形成されたスポット1またはスポット2をアブレーションする。

10 なお、超短パルスレーザー20から出射される超短パルスレーザー光のパルス幅は110フェムト秒であり、出力は230 μ Jである。

そして、四重極質量分析器16によって、ターゲット14への超短パルスレーザー光の照射により発生した一価のイオンの質量を測定した。

図5には、上記した手法により、四重極質量分析器16によって測定されたスポット1ならびにスポット2のアブレーションによる質量スペクトラムが示されている。また、図6は、図5に示されたスポット2のアブレーションにより測定された質量スペクトラムのみを抽出して示すものである。

これら図5ならびに図6に示す実験結果から明らかなように、スポット2からはFeが検出され、本発明の手法によりヘモグロビンを検出することができた。

20 なお、上記した実験1においては、検出しようとするタンパク質に元素標識を付さなかったが、実験2ならびに実験3に示すように、元素標識を付したのもの

解析することができるのは勿論である。以下、実験2ならびに実験3について説明する。

(2) 実験2

(2-1) チップの作成

- 5 まず、ターゲット14となるチップの作成について、図7を参照しながら説明する。このチップの作成は、以下のように行う。
- 即ち、ポリ-L-リジンコートスライドガラスを基板2000として用いた。このポリ-L-リジンコートスライドガラスは、スライドガラスをNaOH処理後に3%ポリ-L-リジンPBS溶液に1時間浸漬し、水で15分間洗浄後に乾燥させて
- 10 作成した。次に、抗streptavidin抗体 (Cortex Biochem社製) および抗mouse IgG抗体 (Southern Biotechnology Associates社製) をそれぞれ0.1mg/mlの濃度でPBS溶液に溶解したものを、3 μ l/スポットで上記のようにして作成したポリ-L-リジンコートスライドガラス上にそれぞれ図7に示すようにスポットし、自然乾燥
- 15 した (図7において、スポット1は抗streptavidin抗体であり、スポット2は抗mouse IgG抗体である。)。それから、乾燥したポリ-L-リジンコートスライドガラスを1.5%BSA、0.1%azide sodium、0.05%Tween 40を含むTris-HCl溶液 (pH 7.8) に15分間浸して洗浄し、
- 20 続いて1.5%BSA、0.1%azide sodiumを含むTris-HCl溶液 (pH 7.8) に浸漬し、4℃で一晩静置した。10,000x g で10分間遠心後に、PBSで洗浄し、ブロッキング溶液を除去した。

なお、上記のようにして作成したチップを2枚準備した（図8参照：チップ1およびチップ2）。

（2-2）タンパク質溶液の調整と反応

ユーロピウム（Eu）でラベルしたストレプトアビジン（パーキンエルマー社製）を0.2mg/mlでTris-HCl溶液（pH7.8）に溶解し、チップ1のスポット1およびスポット2上に3 μ l滴下し、室温で2時間静置した。その後、0.1%Tween20を含むTris-HCl溶液（pH7.8）によりチップ1を室温で30分間洗浄し、自然乾燥させた（図8参照）。

また、ユーロピウム（Eu）でラベルしたマウスIgG（パーキンエルマー社製）を0.2mg/mlでTris-HCl溶液（pH7.8）に溶解し、チップ2のスポット1およびスポット2上に3 μ l滴下し、室温で2時間静置した。その後、0.1%Tween20を含むTris-HCl溶液（pH7.8）によりチップ2を室温で30分間洗浄し、自然乾燥させた（図8参照）。

（2-3）測定

測定方法は実験1の場合と同様であるが、超短パルスレーザー20から出射される超短パルスレーザー光の出力を120 μ Jとし、飛行時間型質量分析器を用いて質量測定を行った点において、実験1の測定方法と異なる。この実験2の実験結果が、図9乃至図12に示されている。ここで、図9はチップ1におけるスポット1の測定結果を示し、図10はチップ1におけるスポット2の測定結果を示し、図11はチップ2におけるスポット1の測定結果を示し、図12はチップ2におけるスポット2の測定結果を示している。

これら図9乃至図12に示す実験結果より、サンプル溶液中に含まれるタンパク質をそれに付加されたラベルを用いて検出できることがわかった。

(3) 実験3

- 5 実験2と同様の方法でチップを作製し、濃度を変えた測定タンパク質溶液を反応させ、定量性の検討を行った。

ここで、タンパク質溶液の調整は、以下のように行なった。即ち、サマリウム(Sm)でラベルしたストレプトアビジン(パーキンエルマー社製)をそれぞれ0.002mg/ml、0.02mg/ml、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.5mg/ml含むTris-HCl溶液(pH7.8)を調整し、
10 実験2と同様の条件で抗ストレプトアビジン抗体をスポットしたチップと反応させ、測定を行なった。

図13にはサンプル濃度が0.2mg/mlの場合の測定結果が示されており、
図14には質量スペクトルより算出したSmの検出量が示されている。この結果
15 より、図15に示すとおり、本発明による手法を用いることによって、サンプル溶液に含まれる測定タンパク質の量を定量的に測定できることが判った。

本発明によれば、超短パルスレーザーにより単数または複数の同位体元素で標識したタンパク質をアブレーションすることにより、構成元素を完全に原子イオン化し、イオン化した標識元素を質量分析することによりタンパク質の定量測定
20 を行うことができる。これにより、多種類の同位体元素を標識として使用するこ

とができるようになる。従って、質量分析することができるタンパク質の対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。

- つまり、本発明によって、同位体元素で標識したタンパク質それ自体を原子レベルでイオン化し、標識元素を検出することが可能となるから、質量分析可能な
- 5 対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。例えば、標識として同位体元素を用いることが可能となり、標識の種類をたとえば安定同位体元素の数である270にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法（2種類）や放射性同位元素（約10種類）と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができる。

10

- なお、上記した実施の形態においては、質量分析器として四重極質量分析器を用いるようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、上記したように原子の飛行時間を測定することにより質量分析を行う飛行時間質量分析器を用いることができ、その場合には、一回のレーザー照射で複数の原子の質量分
- 15 析を同時に行うことができる。また、質量分析器としてイオンサイクロトロン型フーリエ変換質量分析器を用いた場合にも、複数の原子の質量分析を同時に行うことが可能となる。

- また、上記した実施の形態においては、タンパク質の分析方法として質量分析
- 20 に関して説明したが、これに限られるものではないことは勿論であり、質量分析以外の分析に関して本発明を用いるようにしてもよい。

また、上記した実施の形態においては、ターゲット14を移動する移動手段として、ターゲット14を回転する回転導入端子18を用いたが、これに限られるものではないことは勿論であり、ターゲット14を載置可能な移動自在のテーブルなどの適宜の移動手段を用いるようにしてもよい。

また、上記した実施の形態においては、回転導入端子18を用いてターゲット14を回転することにより、ターゲット14を遺漏・重複なくアブレーションするようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、超短パルスレーザー光のターゲットへの照射位置を移動する移動手段を設けるようにして、ターゲット14を遺漏・重複なくアブレーションするようにしてもよい。

また、本発明において、一度に複数の標識を使うマルチチャンネル化については、チップ側に固定する物質をマイクロアレイのように種類ごとにスポットするのではなく、混合物として固定し、そこに測定したい物質ごとに異なる標識をつけた溶液を反応させれば、一つのスポットから複数種類の物質を検出することができるようになる。

このようにすると、マイクロアレイを作製する手間を大幅に省くことができるようになり、ユーザーが測定したい物質を含む溶液を調整するオーダーメイドの基板が簡単に作れるようになる。

また、逆にサンプルを基板上に載せることも可能であり、例えば、測定したい対象に対する抗体をいろいろな種類でラベルしたものをかければ、複数の物質を

測定することができる。

産業上の利用可能性

- 本発明は、以上説明したように構成されているので、タンパク質を構成する構成原子の原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、高分解能の分析装置を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の質量分析方法を提供することができるという優れた効果を奏する。ここで、より詳細には、例えば、質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができるとともに、高分解能の質量分析装置を必要とすることがないという優れた効果を奏する。

また、本発明は、以上説明したように構成されているので、システム構成を大幅に簡潔化することができるという優れた効果を奏する。

- さらに、本発明は、以上説明したように構成されているので、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことができるようになるという優れた効果を奏する。

請 求 の 範 囲

1. 分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、

分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、

- 10 タンパク質を固定したチップに対して該超短パルスレーザー光を照射して、該チップに固定されたタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることによって、該タンパク質を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析する

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

2. 請求項1に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記タンパク質を固定したチップは、該チップに固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質に、該特定のタンパク質が反応して結合することにより、該チップ上に該特定のタンパク質が固定されたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

- 20 3. 請求項2に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質は、タンパク質と特異的な結合性を持った分子である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

4. 請求項3に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に
5 おいて、

前記タンパク質と特異的な結合性を持った分子は、タンパク質と特異的な結合をする核酸である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

5. 請求項2に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に
10 おいて、

前記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質は、タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

6. 請求項5に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に
15 おいて、

前記タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質は、抗体である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

7. 請求項6に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に
おいて、

- 20 前記タンパク質を固定したチップは、前記抗体を固定したチップに前記抗体と反応するタンパク質を含む溶液をかけて、前記抗体と反応するタンパク質と前記

抗体とを反応させ、前記抗体と反応するタンパク質と前記抗体とを結合させてなるものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

8. 請求項1～7のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタン

5 パク質の分析方法において、

前記チップに固定されたタンパク質は、元素標識を付けたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

9. 請求項8に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に
おいて、

10 前記元素標識は、安定同位元素標識である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

10. 請求項8～9のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタ
ンパク質の分析方法において、

前記元素標識は、ピューロマイシン誘導体を用いて標識されたものである

15 レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

11. 請求項8～9のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタ
ンパク質の分析方法において、

前記元素標識は、サンドイッチ法により標識されたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

20 12. 請求項8～9のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタ
ンパク質の分析方法において、

前記元素標識は、サンプル中のタンパク質に直接標識されたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

13. 請求項8～12のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

5 前記チップは、マルチチャンネル化したチップである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

14. 請求項1～10または請求項13のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

10 分析の対象であるタンパク質を含むサンプルと該分析の対象であるタンパク質に標識を付けた標識タンパク質溶液とを混合して前記チップにかけて、前記に固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質と前記分析の対象であるタンパク質と前記標識タンパク質とを競合的に結合させる competitive assayを行い、前記チップ上に該特定のタンパク質を固定する

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

15 15. 請求項1～14のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする
超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が10ピコ秒以下であり、尖頭値出力が
10メガワット以上である

20 レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

16. 請求項15に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方

法において、

分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする
超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、
尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下である

5 レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

17. 請求項1～16のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた
タンパク質の分析方法において、

タンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光と分析の対象であるタン
パク質とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、該タンパク質を

10 アブレーションする短パルスレーザー光により該分析の対象であるタンパク質を
遺漏、重複なくアブレーションして分析を行う

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

18. 請求項1～17のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いた
タンパク質の分析方法において、

15 前記イオン化した構成元素の分析は、飛行時間法による質量分析である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

19. 請求項1～6のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタ
ンパク質の分析方法において、

前記チップ側に固定する物質を混合物として固定し、該混合物に測定したい物

20 質ごとに異なる標識をつけた溶液を反応させ、該混合物から複数種類の物質を検
出する

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

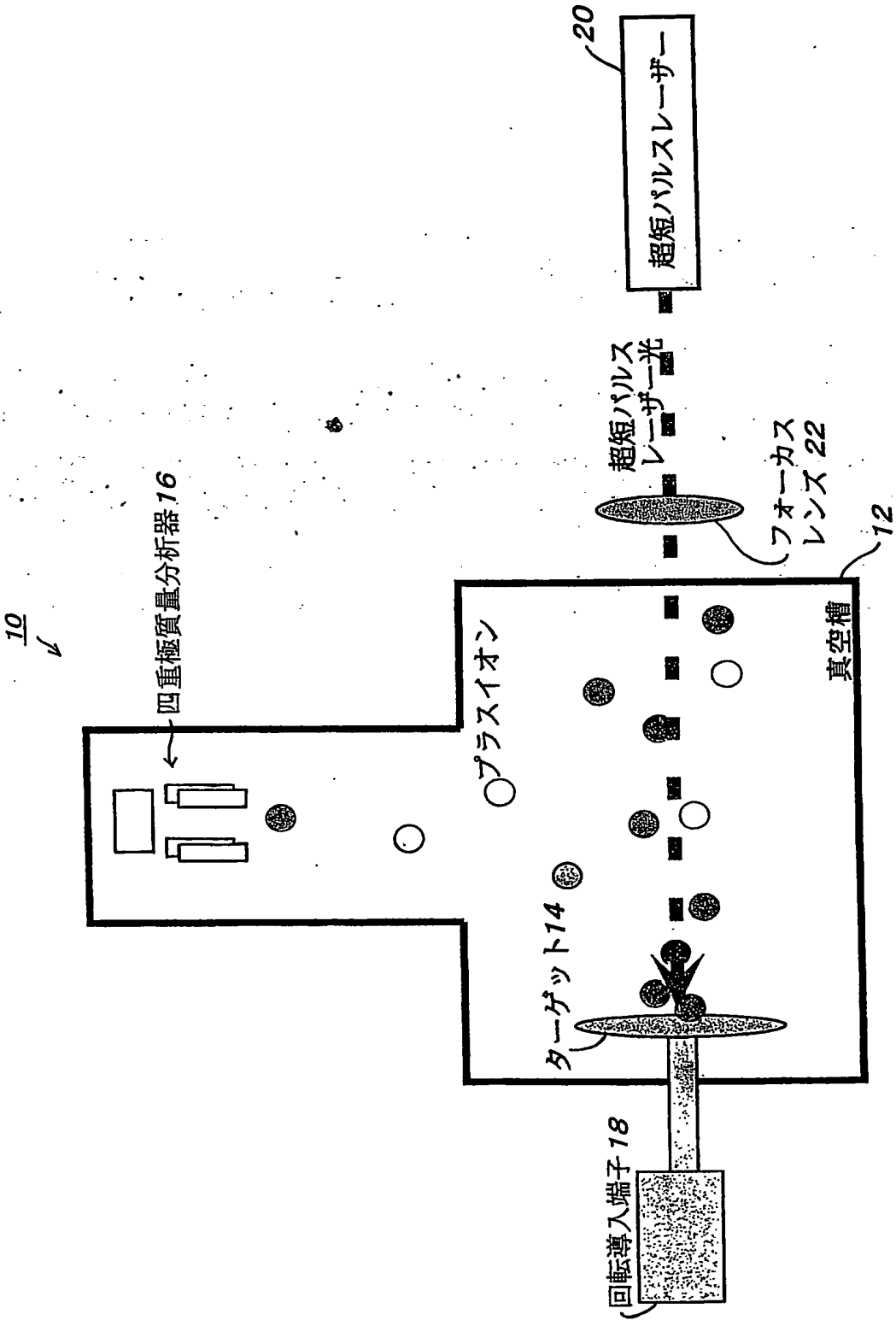
20. 請求項1～6のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記チップにサンプルを固定し、測定対象に対する抗体を複数種類でラベルし

5 たものをかけ、複数の物質を測定する

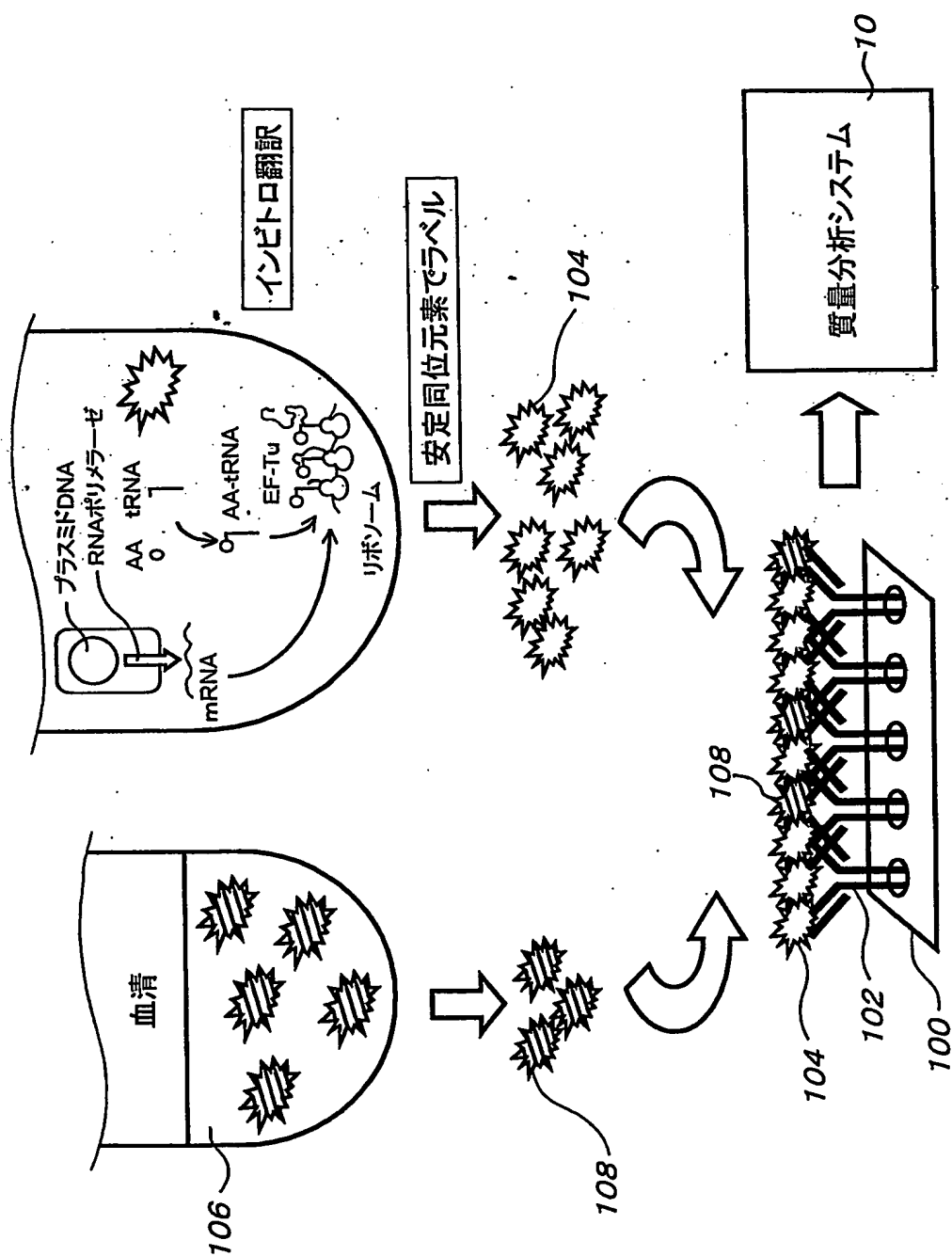
レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

図1



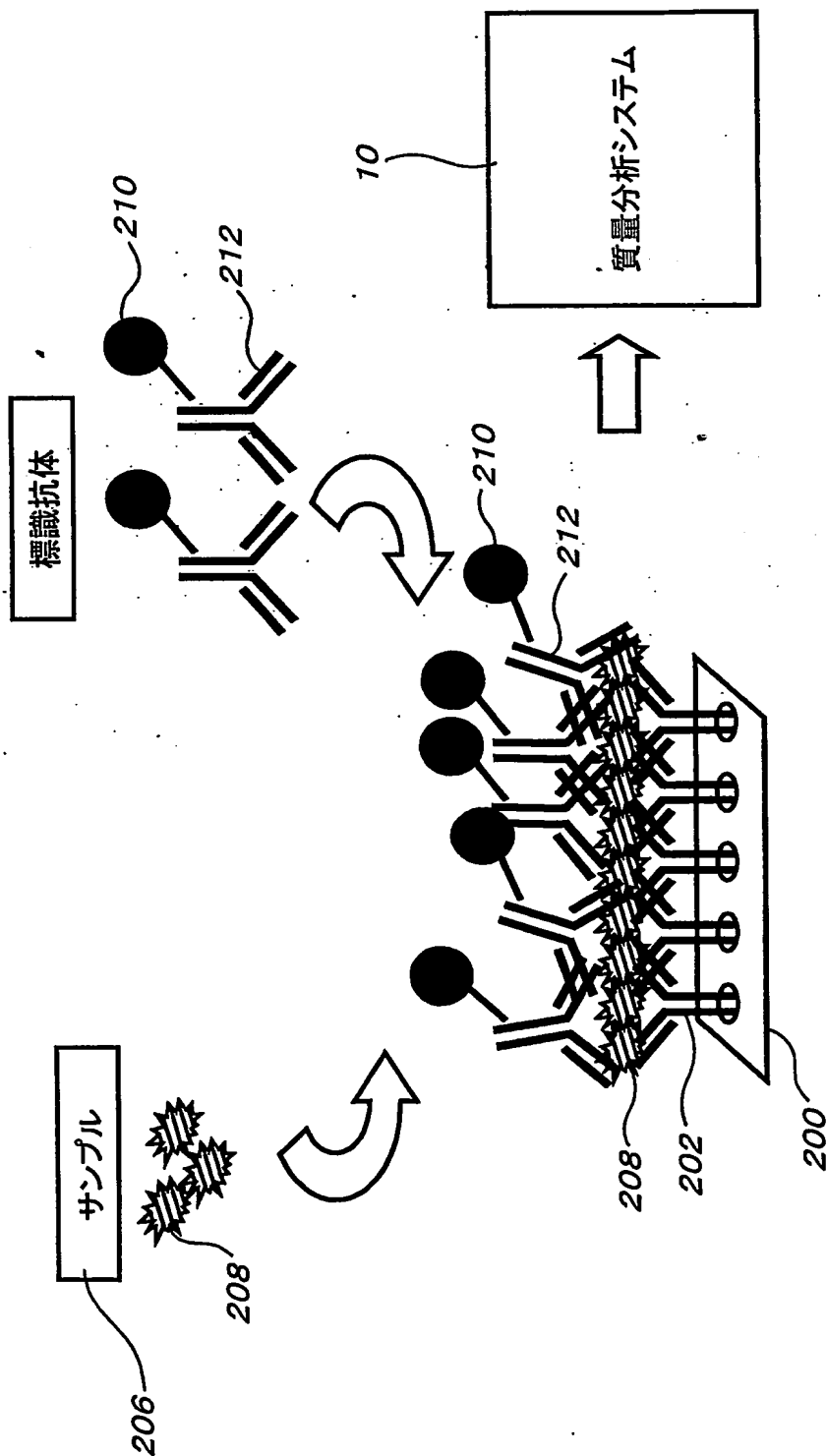
2/15

図2



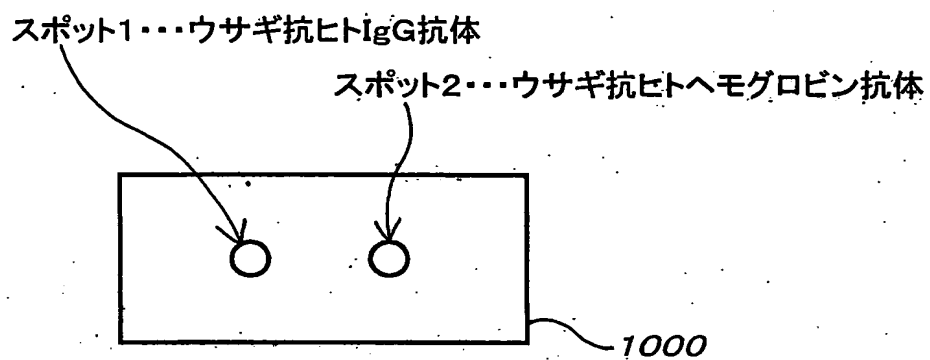
3/15

図3



4/15

図4



スポットの大きさ

 $\phi = 2\text{mm}$

5/15

< Fe(A=56)を検出 >

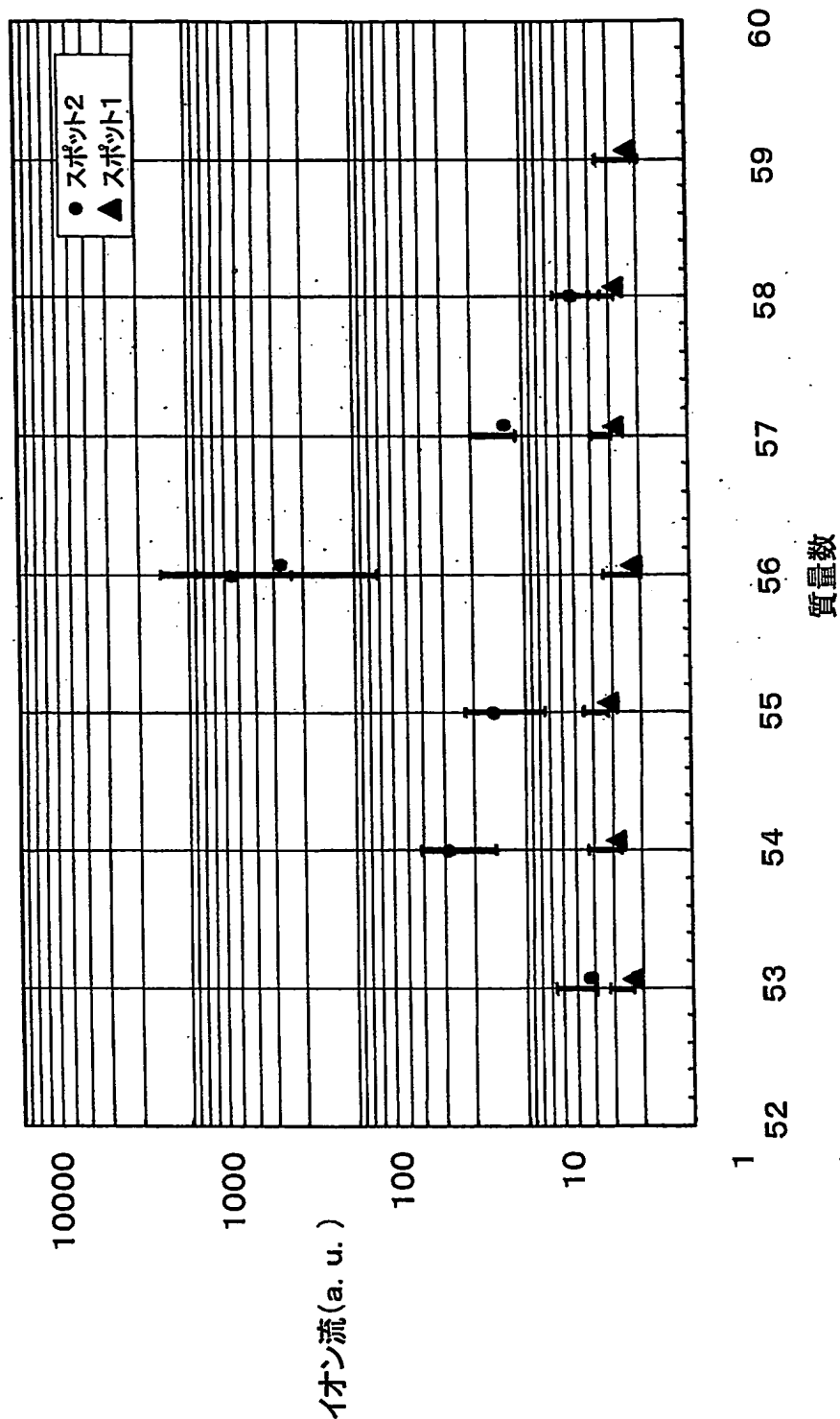
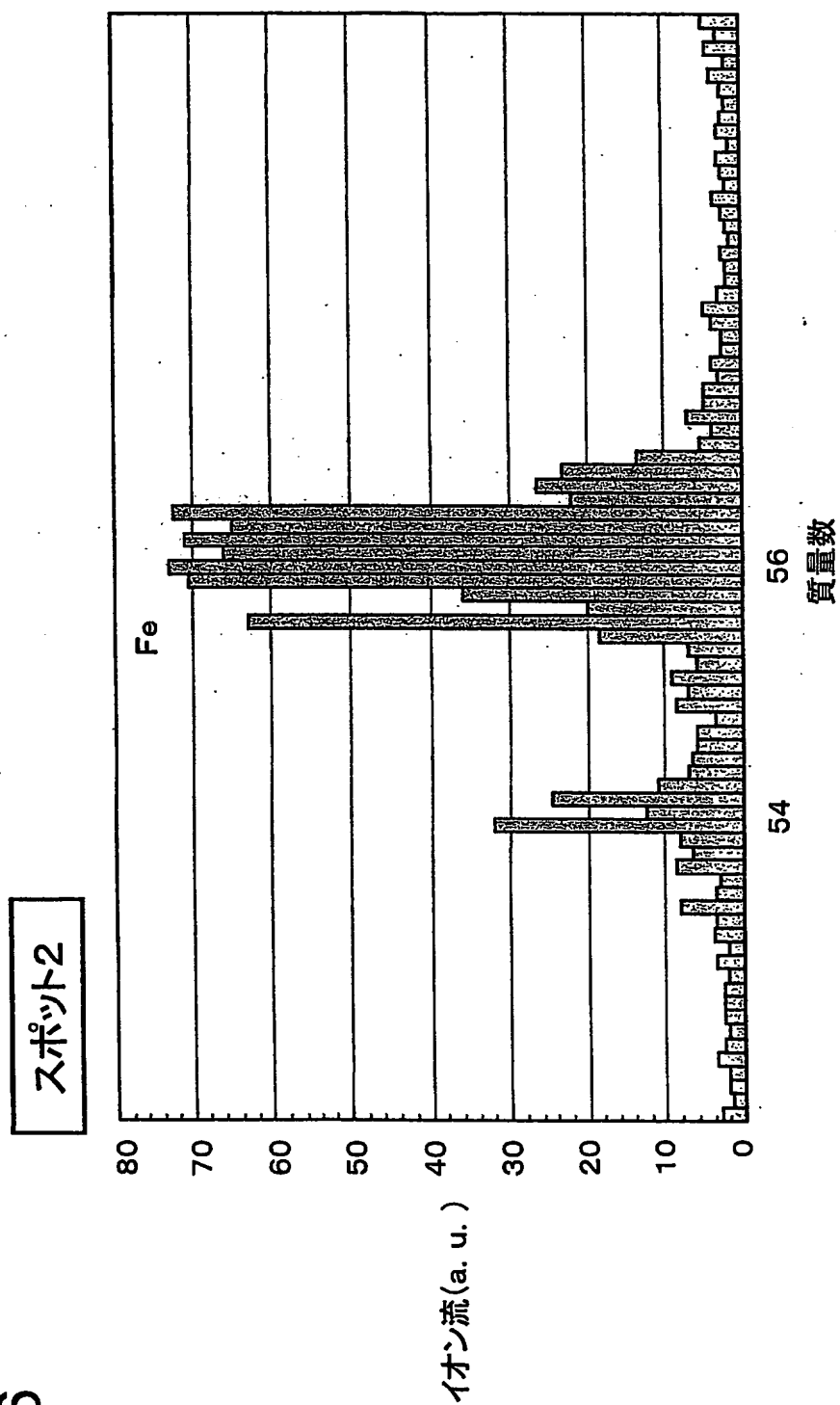


図5

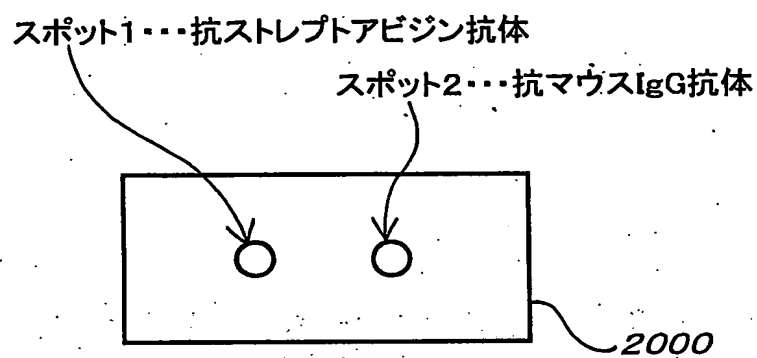
6/15

図6

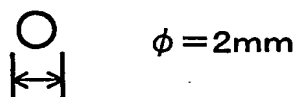


7/15

図7



スポットの大きさ



8/15

図8

チップ1

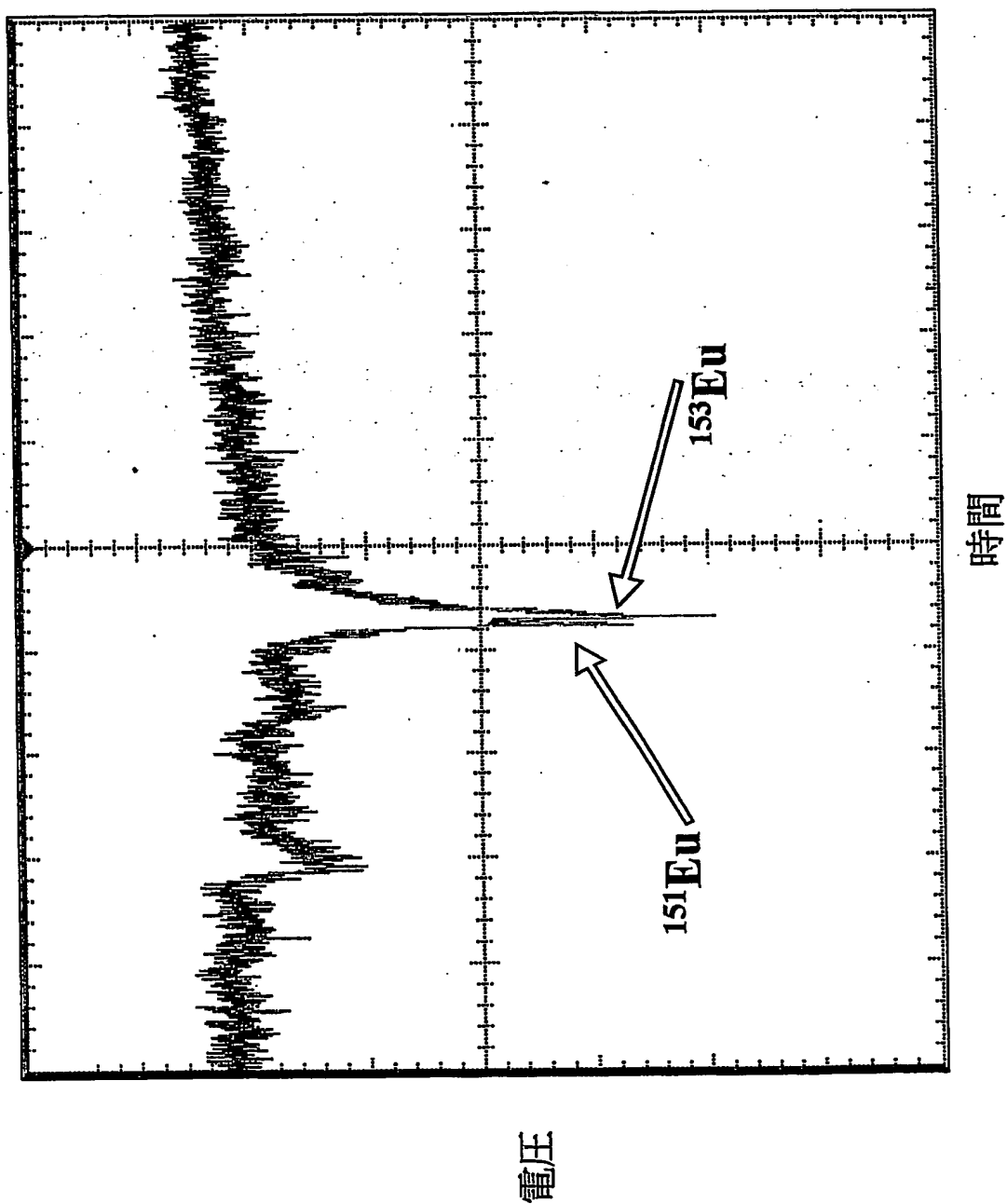
スポット	スポットした物質	測定サンプル	結果
1	抗ストレプトアビジン抗体	Euラベル化ストレプトアビジン	図9
2	抗マウスIgG抗体		図10

チップ2

スポット	スポットした物質	測定サンプル	結果
1	抗ストレプトアビジン抗体	Euラベル化マウスIgG	図11
2	抗マウスIgG抗体		図12

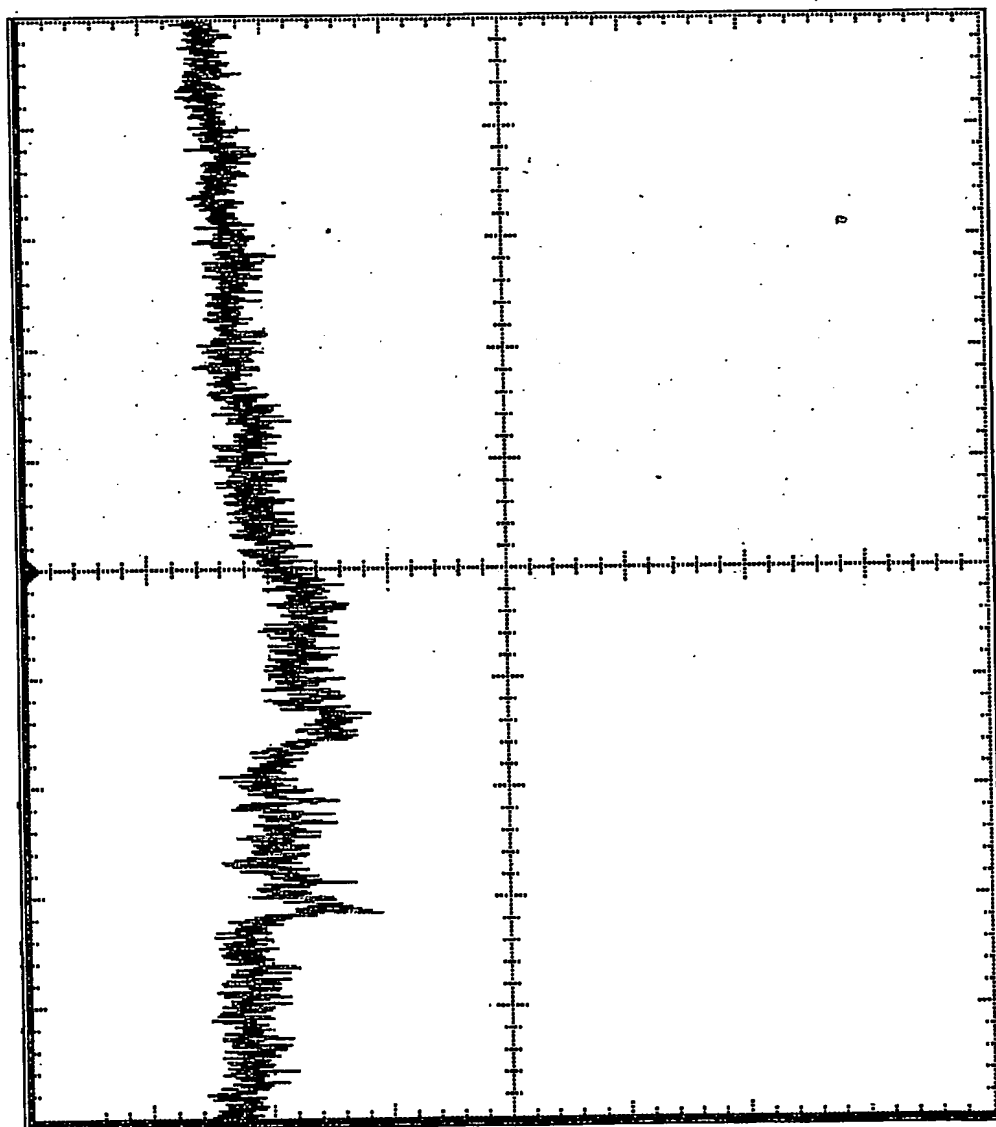
9/15

図9



10/15

図10

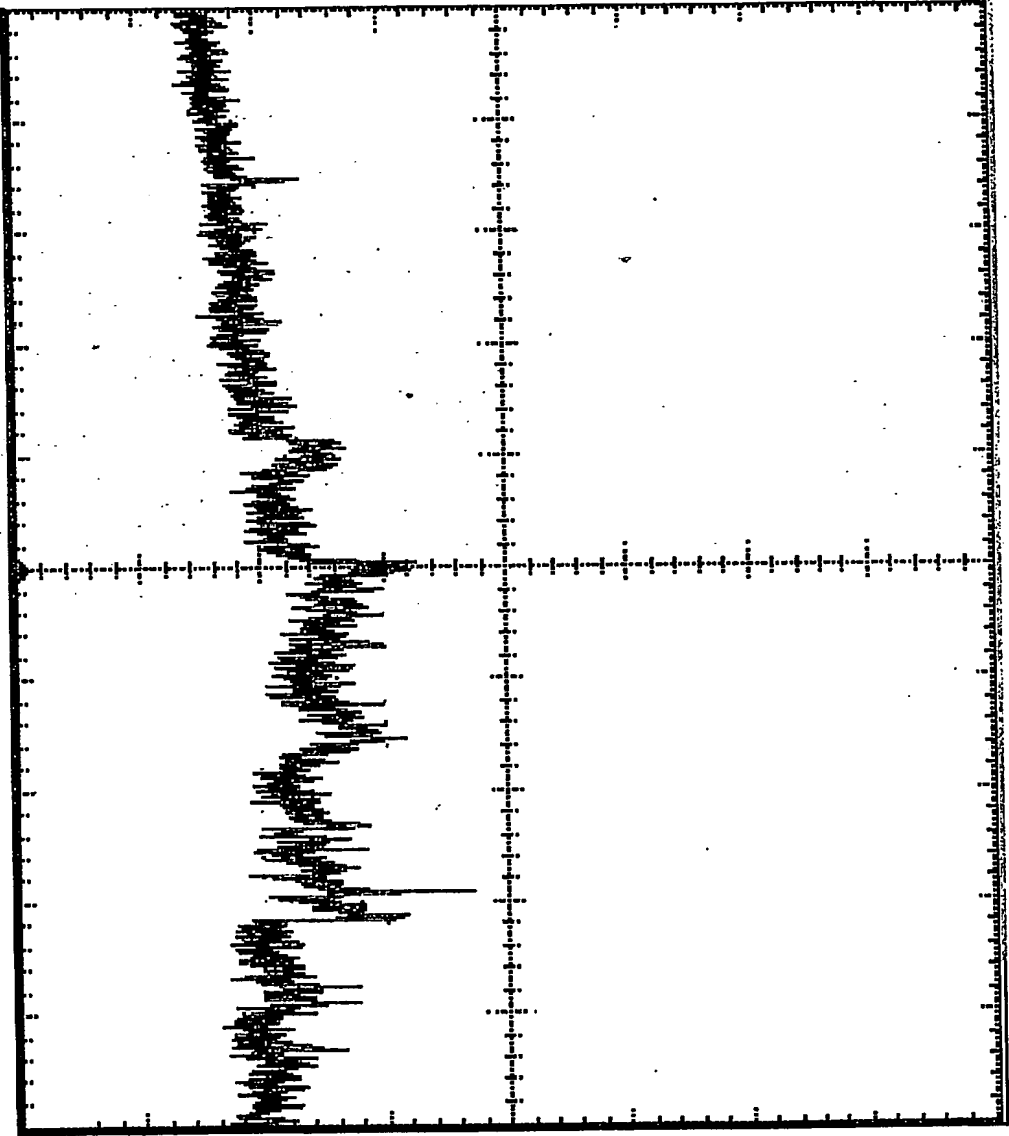


電圧

時間

11/15

図17

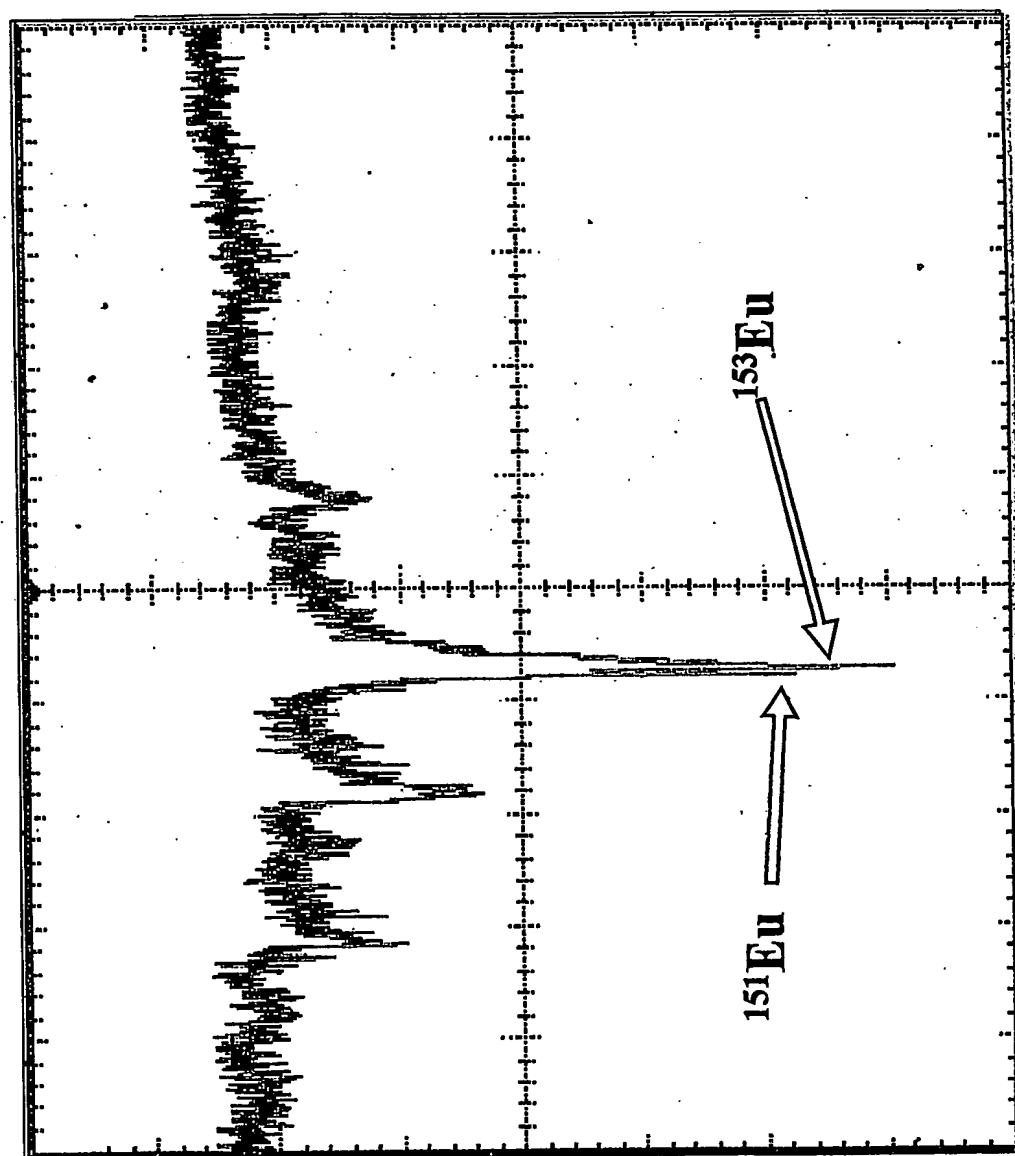


電圧

時間

12/15

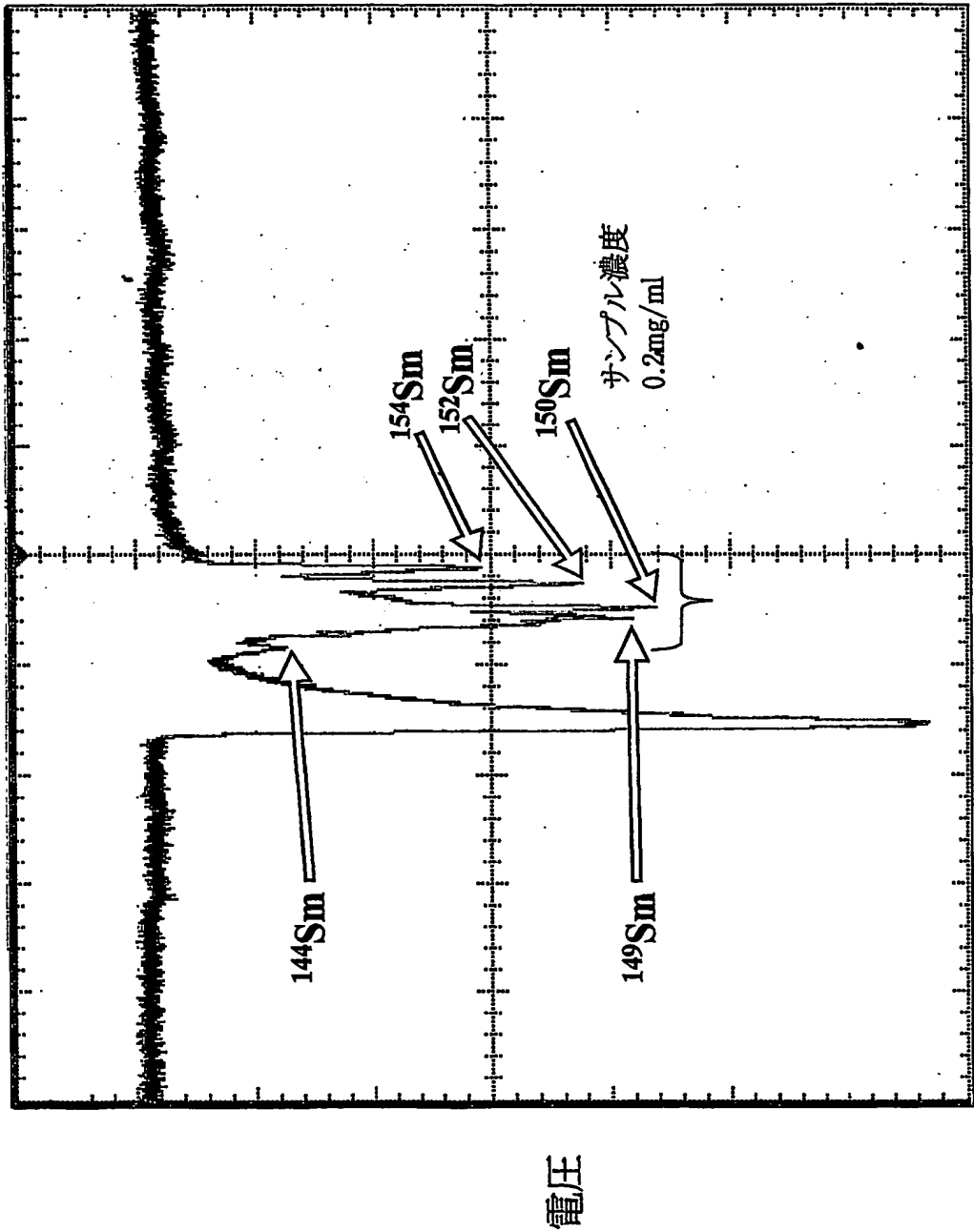
図12



電圧

時間

図13



14/15

図14

サンプル濃度(mg/ml)	Sm量
0.002	29600
0.02	50500
0.1	143100
0.2	265000
0.5	610000

15/15

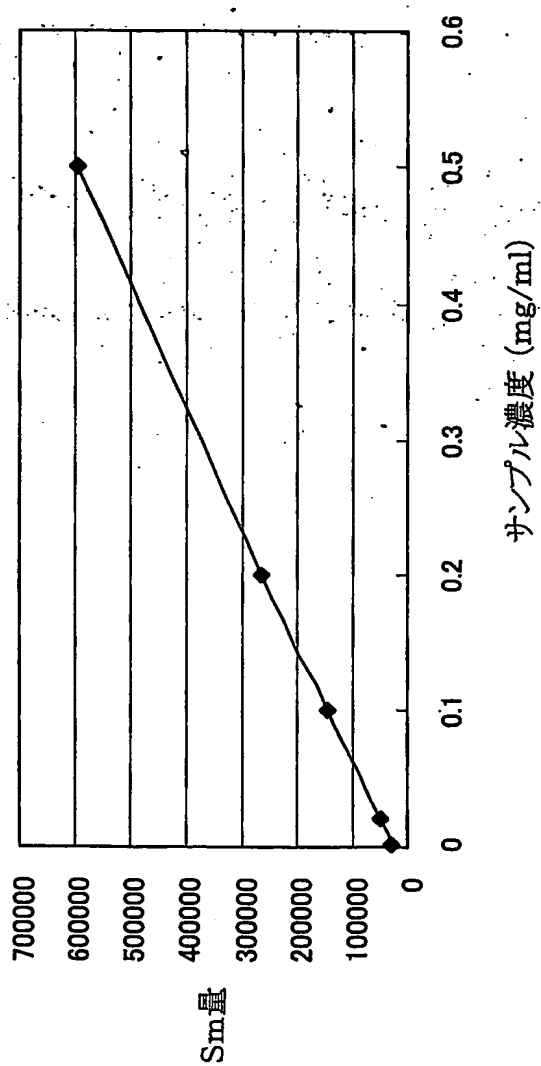


図15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10706

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N27/64, G01N33/68, H01J49/10, H01J49/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), Web of Science

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	M. KURATA-NISHIMURA et al., "Femtosecond laser ablation for simultaneous atomization and ionization (fs-SAI) of large organic molecules", RIKEN Review, No.33, March 2001, pages 18 to 20	1-13, 15-20 14
P, X	WO 02/068952 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 06 September, 2002 (06.09.02), Full text; Figs. 1 to 8 & JP 2002-328114 A	1, 15, 16
Y	US 2002/0060290 A1 (CIPHERGEN BIOSYSTEMS, INC.), 23 May, 2002 (23.05.02), Par. Nos. [0013] to [0071], [0072], [0104] to [0111]; Fig. 1 & WO 01/71326 A2 & JP 2001-281222 A	1-13, 15-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 24 September, 2003 (24.09.03)

Date of mailing of the international search report
 07 October, 2003 (07.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10706

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Z.A. Quinn et al., "Simultaneous determination of proteins using an element-tagged immunoassay coupled with ICP-MS detection", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Vol.17, No.8, 02 July, 2002 (02.07.02), pages 892 to 896	19, 20
A	C.S. Allardyce et al., "Inductively coupled plasma mass spectrometry to identify protein drug targets from whole cell systems", Chemmcomm Communication, Vol.24, 07 December, 2001 (07.12.01), pages 2708 to 2709	1

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/64, G01N33/68, H01J49/10, H01J49/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N27/62-27/70, H01J49/00-49/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), Web of Science

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	M. Kurata-Nishimura, <i>et al.</i> : "Femtosecond laser ablation for simultaneous atomization and ionization (fs-SAI) of large organic molecules" RIKEN Review, No. 33, March 2001, pp. 18-20	1-13, 15-20 14
P, X	WO 02/068952 A (理化学研究所) 2002. 09. 06 全文, 第1-8図 & JP 2002-328114 A	1, 15, 16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 09. 03

国際調査報告の発送日

07.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高場 正光



2W

2910

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 2002/0060290 A1 (CIPHERGEN BIOSYSTEMS, INC.) 2002.05.23 段落[0013], [0071], [0072], [0104]-[0111], 第1図 & WO 01/71326 A2 & JP 2001-281222 A	1-13, 15-18
Y	Z.A.Quinn, <i>et al.</i> : "Simultaneous determination of proteins using an element-tagged immunoassay coupled with ICP-MS detection" Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Vol.17, No.8, 2002.07.02, pp.892-896	19,20
A	C.S.Allardyce, <i>et al.</i> : "Inductively coupled plasma mass spectrometry to identify protein drug targets from whole cell systems" ChemComm Communication, Vol.24, 2001.12.07, pp.2708-2709	1

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.